

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

AC

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C07K 14/755, A61K 38/37	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/10584 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. April 1996 (11.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03892 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Oktober 1995 (02.10.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 35 485.1 4. Oktober 1994 (04.10.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Bernhard [DE/AT]; Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien (AT). MITTERER, Artur [AT/AT]; Am Markt 30, A-2304 Orth/Donau (AT). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). SCHWARZ, Hans-Peter [AT/AT]; Schindlergasse 32, A-1180 Wien (AT). TURECEK, Peter [AT/AT]; Hutweidengasse 41, A-1190 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT). (74) Anwälte: KOLB, Helga usw.; Arabellastrasse 4, D-81924 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, CA, CZ, FI, HU, JP, NO, PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: PROCESS FOR EXTRACTING HIGH-PURITY VON WILLEBRAND FACTOR (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON HOCHREINEM VON WILLEBRAND-FAKTOR (57) Abstract <p>The invention concerns a process for extracting high-purity von Willebrand factor wherein recombinant von Willebrand factor (rvWF) is chromatographically purified by anion exchange chromatography on a quaternary amino-type anion exchanger in a buffer solution comprising buffer substances and optionally salt. The buffer solutions are preferably free from stabilizers, amino acids and other additives. This process produces high-purity recombinant vWF which is free from blood plasma proteins, in particular factor VIII, and is physiologically active. The invention further concerns a pharmaceutical preparation which contains rvWF and is composed of multimers having high structural integrity.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem von Willebrand-Faktor, bei dem rekombinanter von Willebrand-Faktor (rvWF) durch eine Anionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp in einer Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen und ggf. Salz chromatographisch gereinigt wird. Die Pufferlösungen sind vorzugsweise frei von Stabilisatoren, Aminosäuren und anderen Zusätzen. Nach diesem Verfahren lässt sich hochreiner rekombinanter vWF erhalten, der frei von Blutplasmaeiproteinen, insbesondere frei von Faktor VIII ist, und physiologisch aktiv ist. Die Erfindung bezieht sich weiters auf eine pharmazeutische Präparation, die rvWF enthält, welche aus Multimeren mit einer hohen strukturellen Integrität besteht.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Gewinnung von hochreinem von Willebrand-Faktor

B E S C H R E I B U N G

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines hochreinen von Willebrand-Faktors (vWF). Weiterhin bezieht sich die Erfindung auf rekombinanten von Willebrand-Faktor (rvWF), der nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältlich ist, sowie auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die den rvWF enthält.

Bei der Blutgerinnung erfolgt die Umwandlung des flüssigen Blutes in den Blutkuchen, eine gallertige Masse, die die Abdichtung verletzter Blutgefässe durch Pfropfbildung bewirkt. Dabei erfolgt die Umwandlung des im Plasma vorhandenen löslichen Fibrinogens in den faserig-gallertigen Gerinnungsstoff, das Fibrin, in einem mehrstufigen Prozess (sogenannte Blutgerinnungs-Kaskade), an dem mindestens 15 verschiedene, mit römischen Ziffern gekennzeichnete Blutgerinnungs-Faktoren beteiligt sind, von denen jeder, wenn er aktiviert ist, die jeweils nächste inaktive Stufe aktiviert.

Von den Gerinnungsfaktoren zirkulieren Calcium-Ionen, Fibrinogen und Prothrombin (Faktor II) ständig im Blut, andere werden durch Gewebeverletzung oder Kontakt mit Kollagen

oder Phospholipiden aus Thrombocyten (Faktor XII) aktiviert. Unter den übrigen Blutgerinnungs-Faktoren befinden sich mehrere Serin-Proteasen, wie Kallikrein, Thrombin und die aktivierten Faktoren VII, IX, X und XI.

Die Thrombocyten setzen sich unter Anwesenheit von von Willebrand-Faktor (ein Bestandteil des Gerinnungs-Faktors VIII) an Kollagen des verletzten Bindegewebes durch Adhäsion fest. Sie verändern ihre Form und bilden Fortsätze aus, und zudem erleichtert ihre äussere Membran die Adhäsion weiterer Thrombocyten. Danach setzen sie verschiedene Substanzen aus ihren Granula frei, wodurch eine Gefässkonstriktion sowie die Anlagerung und die Aktivierung anderer Faktoren der plasmatischen Blutgerinnung bewirkt werden.

Dem von Willebrand-Faktor kommen in der normal ablaufenden Blutgerinnung direkte und indirekte Aufgaben zu. Er bindet in einem Komplex an den Faktor VIII. Dieser Komplex dient zur Stabilisierung des Faktor VIII. Dieser stabilisierte Faktor VIII hat dann wesentliche Cofaktorfunktion bei der Aktivierung von Faktor X. Der von Willebrand-Faktor greift aber auch direkt in die Blutgerinnung ein, indem er die Plättchenaggregation an verletzten Gefässen vermittelt.

Bei der Hämophilie (Bluterkrankheit) ist die Blutgerinnung durch Mangel an bestimmten plasmatischen Blutgerinnungs-Faktoren gestört. Bei der Hämophilie A beruht die Blutungsneigung auf einem Mangel an Faktor VIII bzw. einem Mangel an vWF, der einen wesentlichen Bestandteil des Gerinnungsfaktors VIII ausmacht. Die Behandlung der Hämophilie A erfolgt durch Ersatz des fehlenden Gerinnungsfaktors durch Faktorenkonzentrate aus Blutkonserven, z.B. durch intravenöse Infusion von Faktor VIII, eines vWF Faktor VIII-Komplexes oder von vWF.

Es gibt mehrere Krankheitsbilder, die auf Unter- oder Überproduktion des von Willebrand-Faktors zurückzuführen sind. So führt z.B. eine Überproduktion von vWF zur vermehrten Neigung von Thrombosen, wohingegen eine Unterversorgung mit vWF eine vermehrte Blutungsneigung oder verlängerte Blutungszeit zur Folge hat.

Das von Willebrand-Syndrom kann sich in mehreren Erscheinungsformen manifestieren. Alle Formen zeichnen sich durch eine verlängerte Blutungszeit aus, die durch ein absolutes Fehlen eines funktionellen vWF begründet sein können. Der Mangel an vWF kann auch eine phänotypische Hämophilie A hervorrufen, da der vWF ein wesentlicher Bestandteil des funktionellen Faktor VIII ist. In diesen Fällen ist die Halbwertszeit des Faktor VIII derart verringert, dass er seine speziellen Funktionen in der Blutgerinnung nicht wahrnehmen kann.

Im Plasma zirkuliert der vWF in einer Konzentration von 5-10 mg/l in Form eines nicht-kovalenten Komplexes mit dem Faktor VIII. Der vWF ist ein Glycoprotein, welches in verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers gebildet und später in die Zirkulation freigesetzt wird. Dabei wird in den Zellen ausgehend von einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 220000 (vWF-Monomer) durch Ausbildung von mehreren Schwefelbrücken ein vWF-Dimer (primäres vWF-Dimer) mit einem Molekulargewicht von ca. 550000 gebildet. Aus den vWF-Dimeren werden dann durch Verknüpfung weitere Polymere des vWF mit immer höheren Molekulargewichten, bis zu ca. 20 Millionen, hergestellt. Es wird vermutet, dass insbesondere den hochmolekularen vWF-Fraktionen eine essentielle Bedeutung bei der Blutgerinnung zukommt.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Reinigung und Konzentrierung von vWF beschrieben, die alle humanes Blutplasma als Quelle für den von Willebrand-Faktor verwenden.

Mit einem hochauflösenden elektrophoretischen Verfahren kann eine Strukturanalyse des vWF vorgenommen werden. Dabei wurde von Baillod et al., Thrombosis Research 66, 745-755, 1992, gefunden, daß die vWF-Multimeren in Banden aufgetrennt werden und jede Multimerenbande ein oder mehrere Satellitenbanden mit sich führt. Dieses Erscheinungsbild wird auf den proteolytischen Abbau von vWF-Multimeren zurückgeführt. Eine einfache Zugabe von Proteaseinhibitoren zu Blutproben konnte diesen Abbau nicht verhindern.

Ein abnormaler vWF vom Typ IIA zeigt ein verändertes Elektrophoresemuster. Als Resultat der Multimerenanalyse wird bei Patienten mit von Willebrand-Krankheit vom Typ IIA gefunden, daß die Multimeren jeweils als Einzelbanden (Singulett) auftreten und nicht in Satellitenbanden aufgespalten werden. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, daß eine Protease-sensitive Bindung zwischen Tyr-842 und Met-843 in den Typ IIA Patienten möglicherweise nicht gespalten wird. Diese Patienten zeigen unterschiedliche Krankheitsbilder im Zusammenhang mit einer Blutungsneigung.

Ein ähnliches Bild der Multimerenbanden wird von Fischer et al., FEBS Letters 351 (1994) 345-348, für einen rekombinanten vWF beschrieben. Dieser rvWF wird von CHO-Zellen exprimiert und eine Multimerenanalyse vorgenommen. Im Gegensatz zu Plasma-vWF wurde keine Tripletstruktur beobachtet. Demzufolge liegt dieser rvWF als vollständig intaktes Protein vor, der proteolytisch nicht abgebaut ist.

Jedoch ist der rvWF noch keinem Behandlungsverfahren, wie einer Reinigung, Virusinaktivierung bzw. Virusanreicherung unterzogen worden. Dementsprechend lag noch keine pharmazeutische Präparation vor.

Die im Stand der Technik beschriebenen vWF-Präparate enthalten den vWF in proteolytisch abgebauter Form. Die Stabilität dieser Präparate ist dadurch begrenzt. Auch die Versuche zur Verhinderung der Proteolyse nach Abnahme einer Blutprobe mit entsprechenden Inhibitoren führten nicht zu einem vWF mit intakter Struktur.

Die EP-A-0503991 beschreibt die Reinigung von vWF aus humanem Kryopräzipitat durch drei aufeinanderfolgende chromatographische Schritte: 1.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE (DEAE-Cellulose, Diethylaminoethyl-Cellulose)-Fraktogel und Elution des vWF durch 0,15 M NaCl; 2. nochmalige

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Fraktogel und Elution des vWF durch 0,17 M NaCl; 3. Affinitätschromatographie an Gelatine-Sepharose®. Als Puffersysteme werden Puffer verwendet, die Aminosäuren und Calciumionen enthalten.

M. Burnouf-Radosevich und T. Burnouf, Vox Sang 62 (1992) 1-11 beschreiben eine ähnliche chromatographische Reinigung von Plasma-vWF durch Kombination einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Fraktogel mit einer Gelatine-Sepharose®-Filtration in einem Puffersystem, das Aminosäuren und Calciumionen enthält.

Die WO-A-8912065 beschreibt die Trennung von Plasma-Proteinen aus Plasma-Kryopräzipitaten durch Bindung der Proteine an DEAE-Fraktogel und stufenweise Elution durch steigende Zugabe von NaCl. Das Verfahren eignet sich

insbesondere zur Gewinnung eines Faktor VIII-Konzentrats hoher Reinheit zur Behandlung von Hämophilie A, sowie zur Gewinnung von Konzentraten von Fibrinogen, vWF und Fibronectin. Die vWF enthaltende Fraktion wird vorzugsweise einer zweiten Chromatographie am gleichen Anionenaustauscher unter Verwendung eines Puffers, der Aminosäuren und Calciumionen enthält, unterworfen.

Die EP-A-0416983 beschreibt die Gewinnung des vWF-Faktor VIII-Komplexes aus menschlichem Plasma durch Ausfällung mit einer Kombination aus Bariumchlorid und Aluminiumhydroxid und anschliessende Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Fraktogel.

Nach Harrison et al., Thrombosis Res. 50 (1988) 295-304 wird der vWF-Faktor VIII-Komplex durch Chromatographie an Dextransulphat-Agarose gereinigt.

Bei der Reinigung des vWF-Faktor VIII-Komplexes nach diesen Verfahren soll allerdings der Faktor VIII:C in hoher Reinheit erhalten werden.

Zur Behandlung der Hämophilie A werden deshalb auch immer besser gereinigte Faktor VIII:C-Konzentrate eingesetzt, die den vWF nicht oder nur noch in Spuren enthalten. Deshalb sind solche Präparate für die Behandlung eines vWF-Mangels nicht geeignet. Der Bedarf an reinem von Willebrand-Faktor-Konzentrat ist also sehr gross.

Die EP-A-0469985 und die US-A-5252710 beschreiben ein Verfahren zur Herstellung von vWF aus Plasma-Kryopräzipitat, der weitgehend frei von Faktor VIII ist, bei dem in einem ersten Reinigungsschritt vWF vom Faktor VIII getrennt wird, weil vWF nicht an der Anionenaustauschersäule gebunden wird, sondern nur der Faktor VIII. In einem zweiten Schritt wird dann die

Salzkonzentration des nicht an den Anionenaustauscher gebundenen Materials wesentlich verringert und vWF an einen zweiten Anionenaustauscher gebunden und dann mit einer Lösung höherer Ionenkonzentration wieder eluiert.

Die DE-A-3904354 beschreibt die Herstellung eines vWF-Konzentrates aus Plasma-Kryopräzipitat durch Trennung des vWF vom Faktor VIII, wobei Faktor VIII an einen Ionenaustauscher gebunden wird, vWF jedoch nicht.

Die US-A-5252709 beschreibt ein Verfahren zur Trennung von Faktor VIII, vWF, Fibronectin und Fibrinogen aus humanem Plasma, wobei zuerst Faktor VIII, vWF und Fibronectin an einen Ionenaustauscher vom DEAE-Typ gebunden werden, und anschliessend mittels steigender Salzkonzentration vom Ionenaustauscher getrennt eluiert werden.

Obwohl diese Verfahren die Reinigung des vWF unter Abtrennung des Faktor VIII beschreiben, kann eine, wenn auch geringfügige Kontamination mit Faktor VIII bzw. mit anderen Blutplasmae Proteinen nicht ausgeschlossen werden.

Alle vWF-Konzentrate, die durch Reinigung des Proteins aus humanem Blutplasma erhalten werden oder in Kontakt mit biologischem Material aus Säugetieren getreten sind, sind ausserdem potentiell mit dem Risiko behaftet, krankheitserregende Moleküle, wie z.B. Viren, vom Plasmaspender zu enthalten.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die zur Verfügungstellung eines effizienten, einfachen und sicheren Verfahrens zur Herstellung eines hochreinen von Willebrand-Faktors, der im wesentlichen frei ist von anderen Blutplasma-Proteinen, und insbesondere frei ist von Faktor VIII.

Der Erfindung lag weiters die Aufgabe zugrunde ein pharmazeutisches Präparat zur Verfügung zu stellen, welches einen vWF enthält, dessen Stabilität gegenüber den bisher bekannten Präparaten verbessert ist.

Diese Aufgabenstellung wird mit dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung gelöst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem von Willebrand-Faktor, bei dem rekombinanter von Willebrand-Faktor (rvWF) durch eine Anionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp chromatographisch gereinigt wird.

Vorzugsweise wird der durch die Anionenaustauschchromatographie gereinigte rvWF weiterhin durch eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Heparin in einer Pufferlösung, bestehend aus Puffersubstanzen und gegebenenfalls Salz, chromatographisch gereinigt

Rekombinanter von Willebrand-Faktor wird aus dem zellfreien Kulturfiltrat transformierter, virusfreier, tierischer Zellen mittels Zellkulturtechnik gewonnen.

Bevorzugte Ausgestaltungen dieses Verfahrens sind Gegenstand der Ansprüche 2 bis 13.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter von Willebrand-Faktor, der frei von Blutplasma-Proteinen, insbesondere frei von Faktor VIII ist, und der nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältlich ist. Dieser rekombinante von Willebrand-Faktor ist physiologisch aktiv.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung eines nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältlichen rvWF zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand-Disease. Weiterer Gegenstand ist auch die Verwendung dieses rekombinanten von Willebrand-Faktors zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand-Disease.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäss Anspruch 18, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie den nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältlichen rvWF in einem physiologisch annehmbaren Träger enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Präparation enthaltend den virussicheren rvWF, der aus Multimeren mit einer hohen strukturellen Integrität besteht.

Rekombinanter vWF (rvWF) wird aus zellfreiem Kulturmedium nach Fermentation tierischer Zellen isoliert und gereinigt. Das für die Fermentation verwendete Kulturmedium stellt eine für derartige Zwecke übliche komplexe, synthetische Mischung aller zum Leben der tierischen Zellen notwendigen Stoffe, wie Vitamine, Zucker, Salze, Hormone, Antibiotika und Puffersubstanzen, dar und unterscheidet sich daher in allen grundlegenden Eigenschaften wesentlich von der

Zusammensetzung von menschlichem Blutplasma oder Plasma-Kryopräzipitat. Es war deshalb nicht vorauszusehen, dass sich das erfindungsgemässe Verfahren in hervorragender Weise zur Herstellung von hochreinem von Willebrand-Faktor eignen würde. Bei dem erfindungsgemässen Verfahren wird vorzugsweise ein rekombinantes vWF-Konzentrat aus zellfreien Kulturüberständen transformierter Zellen eingesetzt.

Im erfindungsgemässen Verfahren wird als Puffersystem eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen und ggf. Salz, vorzugsweise Kochsalz, verwendet, die vorzugsweise frei von Stabilisatoren, Aminosäuren und anderen Zusätzen ist. Aus dem Stand der Technik ist bekannt, dass Stabilisatoren, Aminosäuren und andere Zusätze benötigt werden, um einerseits den von Willebrand-Faktor zu stabilisieren, andererseits den Faktor VIII - von Willebrand Komplex zu destabilisieren und auch die Abtrennung anderer Proteine zu erleichtern. Bei dem erfindungsgemässen Verfahren kann gänzlich auf solche Komponenten im Puffer verzichtet werden, wobei trotzdem ein physiologisch aktiver rekombinanter von Willebrand-Faktor erhalten wird.

Als Puffersystem wird vorzugsweise ein von Stabilisatoren, Aminosäuren und anderen Zusätzen freies Puffersystem, wie z.B. Tris-HCl/NaCl-Puffer, Phosphatpuffer, Citratpuffer verwendet.

Die Anionenaustauschchromatographie und/oder die Affinitätschromatographie werden vorzugsweise in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, und besonders bevorzugt bei einem pH-Wert von 7,4, durchgeführt.

Die Elution des bei der Anionenaustauschchromatographie an den Anionenaustauscher und bei der Affinitätschromatographie an immobilisiertes Heparin gebundenen rvWF erfolgt vorzugsweise durch Erhöhung der Salzkonzentration.

Als Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp wird vorzugsweise ein Fraktogel mit Tentakelstruktur und insbesondere EMD-TMAE-Fraktogel verwendet.

Vorzugsweise wird der rvWF an den Anionenaustauscher bei einer Salzkonzentration von < 270 mM gebunden, und bei einer Salzkonzentration > 270 mM, und vorzugsweise bei > 280 mM, eluiert. Als Salze sind lösliche ein- und zweiwertige Salze verwendbar, wobei NaCl bevorzugt wird.

Für die Affinitätschromatographie kann jeder Träger, an dem Heparin gebunden werden kann, verwendet werden. Als gut geeignet erwiesen sich zum Beispiel AF-Heparin-Toyopearl® (ein synthetisches grossporiges, hydrophiles Polymer auf der Basis von Methacrylat; Tosohaas), Heparin EMD-Fraktogel® (ein synthetisches hydrophiles Polymer auf der Basis von Ethylenglykol, Methacrylat und Dimethacrylat; Merck) oder Heparin Sepharose Fast Flow® (enthaltend natürliche Dextran- bzw. Agarosederivate; Pharmacia).

Vorzugsweise wird der durch die Stufe der Anionenaustauschchromatographie vorgereinigte rvWF an das immobilisierte Heparin bei einer Salzkonzentration < 150 mM gebunden, und bei einer Salzkonzentration von > 150 mM, vorzugsweise von 200 bis 300 mM und bevorzugter 160 mM bis 270 mM eluiert. Als Salz sind lösliche ein- und zweiwertige Salze verwendbar, wobei NaCl bevorzugt wird.

Aufgrund der Molekulargrösse des rvWF (Molekulargewicht von 500.000 bis mehrere Millionen) werden bei dem erfindungsgemässen Verfahren sowohl bei der Anionenaustauschchromatographie als auch bei der Affinitätschromatographie vorzugsweise solche Trägermaterialien, wie z.B. Gele mit Tentakelstruktur, verwendet, die das rvWF-Molekül in seiner Diffusion und Verteilung innerhalb der Trägerstruktur nicht behindern.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäss der Erfindung wird das zellfreie Kulturmedium zuerst an einem starken Anionenaustauscher filtriert, wobei der rvWF durch den Austauscher gebunden wird. Als Anionenaustauscher wird vorzugsweise ein grossporiges Gel mit Tentakelstruktur und mit einer stark bindenden Ionenaustauschergruppe vom quaternären Amino-Typ, wie z.B. EMD-TMAE-Fraktogel, verwendet. Nach Entfernung von Begleitproteinen und Verunreinigungen mittels salzhaltigem, vorzugsweise NaCl-haltigem Puffer wird rvWF dann vom Ionenaustauscher in angereicherter Form eluiert. Im zweiten Reinigungsschritt der Affinitätschromatographie wird das den rvWF enthaltende Eluat mit einem Affinitätsträger mit kovalent gebundenem Heparin in Kontakt gebracht, wobei rvWF an diesen Träger bindet. Nach der Entfernung von Fremdschubstanzen und Fremdproteinen durch ein geeignetes Elutionsmittel (wie z.B. Puffersubstanz) wird der rvWF vom Affinitätsträger eluiert, vorzugsweise mittels eines NaCl enthaltenden Puffersystems.

Nach dem erfindungsgemässen Verfahren zur Gewinnung eines hochreinen von Willebrand-Faktors lässt sich auf effiziente und einfache Weise ein hochreiner rvWF erhalten, der frei von Antikörper, frei von Blutplasmaeoteinen, und insbesondere frei von Faktor VIII, physiologisch aktiv und frei von pathogenen Viren ist.

Der hochreine rvWF ist des weiteren dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil des vWF-Proteins zum Gesamtprotein mindestens 80 %, insbesondere mindestens 86 %, beträgt.

Der nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältliche hochreine rvWF kann aufgrund seiner Eigenschaft, dass er frei von Antikörper, frei von Plasmaproteinen, frei von pathogenen Viren und frei von Faktor VIII ist, bei der Behandlung von Hämophilie A gezielt eingesetzt werden.

Des weiteren kann der nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältliche hochreine rvWF zur Behandlung verschiedener Formen der von Willebrand-Disease verwendet werden.

Erfindungsgemäß wird weiters eine stabile pharmazeutische Präparation zur Verfügung gestellt, die einen rvWF enthält, der aus Multimeren mit einer hohen strukturellen Integrität besteht. Der rvWF ist derart stabil, daß er als virussicheres Präparat zur Verfügung gestellt werden kann. Die Virussicherheit ist durch Verfahrensschritte zur Behandlung des rvWF zur Inaktivierung von Viren bzw. Abreicherung von Viren gewährleistet.

Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. in festem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verlässlich inaktivieren kann. Beispielsweise wird die erfindungsgemäße Präparation gemäß der EP 0 159 311 in festem, nassen Zustand hitzebehandelt. Andere Verfahren zur Virus-Inaktivierung umfassen auch die Behandlung mit Detergenzien oder chaotropen Substanzen, beispielsweise gemäß der EP 0 519 901, WO 94/13329, DE 44 34 538, EP 0 131 740 und WO 90/15613.

Der rvWF ist in der erfindungsgemäßen Präparation vorzugsweise als hochreines Protein enthalten, welches durch ein chromatographisches Reinigungsverfahren erhalten wird. Die chromatographische Reinigung erfolgt insbesondere durch Ionenaustauschchromatographie und/oder Affinitätschromatographie. Dafür können u. a. Materialien zum Anionenaustausch, darunter synthetische Trägermaterialien oder Träger auf Kohlenhydratbasis, mit Liganden, wie DEAE-, TMAE-, QAE-, Q- oder Aminoalkylgruppen herangezogen werden, bzw. Träger mit immobilisierten Substanzen, die eine spezifische Affinität für vWF aufweisen. Geeignete Affinitätsmaterialien enthalten beispielsweise Heparin. Dieses Reinigungsverfahren eignet sich v. a. für die großtechnische Gewinnung des rvWF.

Dabei ist zu beachten, daß überraschenderweise der rvWF in der erfindungsgemäßen Präparation eine ausreichende Resistenz gegenüber einem proteolytischen Abbau aufweist, sodaß auf den Zusatz üblicher Stabilisatoren verzichtet werden kann. In Ausnahmefällen kann aber auch während des Herstellungsverfahrens ein entsprechender Proteaseinhibitor zugesetzt werden, um die intakte Struktur zu erhalten. Zur weiteren Unterstützung der Stabilität des vWF kann das pharmazeutische Präparat auch ein Polyalkylenglycol, wie PEG oder Polypropylenglycol, oder Glycerin in einer Konzentration enthalten, die den rvWF nicht präzipitiert und physiologisch verträglich ist.

Erfindungsgemäß zeigt der rvWF in dem Präparat nach elektrophoretischer Analyse Multimerenbanden in Abwesenheit von Satellitenbanden. Dies entspricht der Struktur eines vWF als nicht-fragmentiertes, also intaktes Protein. Vorzugsweise zeigt der rvWF im pharmazeutischen

Präparat das gesamte Spektrum an Multimeren, insbesondere auch den vWF mit hohem Molekulargewicht, ähnlich der nativen Multimerenverteilung.

Die Stabilität der erfindungsgemäßen Präparation ist vor allem für ein Flüssigpräparat erforderlich. Eine Lösung des erfindungsgemäßen Präparates ist beispielsweise bei Raumtemperatur mindestens 48 Stunden stabil, vorzugsweise mindestens 72 Stunden, und bei 4°C mehr als 2 Jahre lagerfähig. Die Stabilität zeigt sich durch einen nur unwesentlichen Aktivitätsverlust von weniger als 50%, vorzugsweise weniger als 20%, am meisten bevorzugt weniger als 10%.

Damit eignet sich das erfindungsgemäße Präparat als Infusionspräparat, welches auch über eine Dauer von mehreren Stunden einem Patienten infundiert werden kann ohne Risiko der Veränderung des Präparates und der Notwendigkeit der Veränderung des Dosierungsschemas. Hinsichtlich der Vermeidung von möglichen Nebenwirkungsreaktion ist es gleichfalls vorteilhaft ein Protein mit intakter und stabiler Struktur zu verabreichen.

Es hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat ohne Nebenwirkungsreaktionen, wie Thrombosebildung, Thrombozytenaktivierung oder Thrombozytopänie an einen Patienten verabreicht werden kann. Dies war vor allem deshalb überraschend, weil der rvWF im erfindungsgemäßen Präparat ein ähnliches Multimerenmuster aufweist wie die für die Typ IIA-von Willebrand-Krankheit verantwortliche Form.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfolgen, z.B. mit Hilfe von Salzen und gegebenenfalls Aminosäuren, aber auch in Gegenwart von Tensiden vorgenommen werden. Vorzugsweise werden Salze, wie z.B.

Natriumchlorid oder Kalziumchlorid, verwendet und ein pH im Bereich von 6-8 gewählt. Als Aminosäuren sind Glycin oder Lysin bevorzugt. Ebenso kann ein pharmazeutisch akzeptabler Puffer gewählt werden. Aufgrund der hohen Stabilität des rvWF kann üblicherweise auf die Verwendung von Stabilisatoren, wie Trägerproteine oder Inhibitoren in der Formulierung verzichtet werden.

Die bevorzugte Konzentration des rvWF in der verabreichungsfertigen Lösung ist im Bereich von 1 bis 100 Einheiten/ml. Durch die hohe Reinheit des Präparates kann dieses auch in Konzentrationen bis zu 1000 E/ml formuliert werden. Die Aktivität ist durch die Ristocetin-medierten Plättchenaggregation charakterisiert und wird als Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (RCoF) angegeben (siehe dazu Journal of Clinical Investigation 52, 2708-2716, 1973). Die übliche Dosis für den vWF liegt im Bereich von 40-80 RCoF-Einheiten/kg in Intervallen von 6-48 Stunden. Als initiale Dosis kann auch eine höhere Dosis bis zu 200 RCoF gewählt werden.

Die Halbwertszeit des rvWF nach Verabreichung des erfindungsgemäßen Präparates ist überraschenderweise mit einer biologischen Halbwertszeit von mehr als 20 Stunden deutlich länger als für die Präparate des Stand der Technik.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird der rvWF in einer Form erhalten, die nach Verabreichung an ein Säugetier das Multimerenmuster mit einer Singulettstruktur beibehält. Eine proteolytische Aufspaltung der Singulett in Satellitenbanden bleibt somit aus.

Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation den rvWF als einzigen wesentlichen Bestandteil. Somit kann diese Präparation im wesentlichen aus hochgereinigten rvWF bestehen.

Auch kann der nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältliche rvWF zur Stabilisierung von Faktor VIII, von rekombinant hergestelltem Faktor VIII oder funktionellen Deletionsmutanten von Faktor VIII verwendet werden, wobei die Stabilisierung in vitro nachgewiesen werden kann.

Ein so stabilisiertes Faktor VIII-Präparat ist nicht wie Plasmaprodukte mit dem Risiko behaftet, mit pathogenen Viren kontaminiert zu sein.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass rvWF eine potentiell höhere Bindungskapazität an Faktor VIII besitzt und damit Faktor VIII effizienter bindet als plasmatischer vWF.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhältlicher rvWF, dadurch gekennzeichnet, dass er erhöhte Bindungskapazität für Faktor VIII aufweist.

Zur Herstellung pharmazeutischer Präparationen werden die den hochreinen rekombinanten von Willebrand-Faktor enthaltenden Fraktionen vorzugsweise aufkonzentriert und das Konzentrat weiter verarbeitet.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in einer zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand-Disease üblichen und gebräuchlichen Darreichungsform vorliegen; vorzugsweise liegen sie in Form eines zur Infusion geeigneten Präparates vor.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert, ohne sie darauf zu beschränken.

Das Beispiel 1 beschreibt die Reinigung von aus zellfreiem Kulturmedium nach Fermentation transformierter tierischer Zellen erhaltenem rvWF durch Anionenaustauschchromatographie. Die weiterführende Reinigung durch die Verfahrensstufe der Affinitätschromatographie ist im Beispiel 2 beschrieben.

Fig. 1 stellt eine 8%-ige SDS-PAGE Auftrennung von rvWF dar. Spur A: Kulturmedium; Spur B: Fraktion 280 mM NaCl nach dem Fraktogel; Spur C: 270 mM NaCl Fraktion nach der Heparin-Affinitätschromatographie; Spur D: Molekulargewichtsmarker.

BEISPIEL 1**Reinigung von rvWF aus Kulturüberständen durch Anionenaustauschchromatographie:**

Rekombinanter vWF wurde gemäss üblicher Verfahren nach Infektion von Vero Zellen (Affennierenzellen) mit Vaccinia-Virus in Zellkulturtechnik gewonnen. Vero/Vaccinia Expressionssysteme und Zellkulturbedingungen werden in F.G. Falkner et al., Thrombosis and Haemostasis 68 (1992) 119-124, N. Barrett et al., AIDS Res. 5 (1989) 159-171 und F. Dorner et al., AIDS Vaccine Research and Clinical Trials, Marcel Dekker, Inc, New York (1990), ausführlich beschrieben. Die Expression von rvWF erfolgte in synthetischem DMEM-Standardmedium (Dulbeccos minimal essential medium).

Rekombinanter vWF kann auch durch Transformation von CHO-Zellen gewonnen werden.

Nach der Fermentation der transformierten Zellen wurde das Kulturmedium abgetrennt, und Zellen und Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt. Weitere kleinere Bestandteile, wie Membranbruchstücke oder Bakterien, wurden durch Filtration durch Filter mit einer Porengrösse von 0,4 µm entfernt.

770 ml zellfreier Kulturüberstand wurde mit einer Fliessgeschwindigkeit von 2 ml/cm²/min über eine Säule (1,6 cm x 5 cm, gefüllt mit 10 ml Anionenaustauscher EMD-TMAE-Fraktogel (Merck)) filtriert. Das Gel wurde zuvor mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) equilibriert. Anschliessend wurde die Säule mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) gewaschen.

Fremdstoffe wurden durch Waschen der Säule mit 200 mM NaCl enthaltendem Puffer entfernt. Der rvWF wurde dann mit 280 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) vom Träger eluiert. Schliesslich wurde mit 1 M NaCl eventuell vorhandenes Restmaterial von der Säule eluiert. Während der Chromatographie wurde die Proteinabsorption in üblicher Weise bei 280 nm verfolgt. Nach der Chromatographie wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford Methode (M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254) bestimmt. Der Gehalt an rvWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA Systems (Boehringer Mannheim) bestimmt.

Es wurde gefunden, dass nahezu der gesamte rvWF an den Träger gebunden wurde. rvWF wurde durch 0,28 M NaCl vom Anionenaustauscher eluiert. Die Ergebnisse der Reinigung von rvWF am Anionenaustauscher sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Durch die in diesem Beispiel beschriebene Reinigung wurde der rvWF um das 6-fache angereichert.

TABELLE 1

Probe	Volumen (ml)	Gesamtprotein ($\mu\text{g/ml}$)	rvWF ($\mu\text{g/ml}$)	rvWF/ Gesamtprotein
Zellfreier Kulturüberstand	770	113	7,9	0,069
Elution mit 200 mM NaCl	95	147	0,0016	0,00001
Elution mit 280 mM NaCl	75	168	61	0,36
Elution mit 1 M NaCl	50	196	6	0,03

BEISPIEL 2**Reinigung von rvWF durch Affinitätschromatographie:**

Ein nach Beispiel 1 erhaltener rvWF wurde zur Verringerung der Salzkonzentration (160 mM NaCl) mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) verdünnt. Anschliessend wurde die Lösung durch eine Säule (1,6 cm x 5 cm, gefüllt mit 10 ml AF Heparin Toyopearl 650 (Tosohaas)) mit einer Fliessgeschwindigkeit von 1 ml/cm²/min filtriert. Die Säule war zuvor mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) equilibriert worden. Unspezifisch gebundene Proteine wurden zuerst durch Waschen mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) entfernt. rvWF wurde durch 270 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) vom Träger eluiert. Schliesslich wurde mit 1 M NaCl Restmaterial von der Säule eluiert. Während der Chromatographie wurde die Proteinabsorption in üblicher Weise bei 280 nm verfolgt. Nach der Chromatographie wurde die Proteinkonzentration mittels der Bradford Methode (M. Bradford, l.c.) bestimmt. Der Gehalt an rvWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA Systems (Boehringer Mannheim) bestimmt.

Es wurde gefunden, dass nahezu der gesamte rvWF an den Träger gebunden wurde. Bei der Elution mit 270 mM NaCl wurde der Grossteil des rvWF von der Säule eluiert, während die Waschung mit 1 M NaCl nur noch Spuren von rvWF enthält. Die Ergebnisse dieses Reinigungsschrittes sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Durch diesen Reinigungsschritt wurde der Anteil des rvWF-Proteins zum Gesamtprotein auf über 86 % erhöht.

Mit einer denaturierenden SDS-Proteingelelektrophorese (U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680-685) und anschliessendem Western-Blot wurde die Fraktion von 270 mM NaCl genauer untersucht.

Wie in Figur 1 dargestellt, ergab die denaturierende elektrophoretische Analyse, dass durch die im Beispiel 1 und 2 beschriebene Reinigung rvWF in hoher Reinheit gewonnen wurde. Im so gewonnenen Produkt konnten keine anderen Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Faktor VIII, nachgewiesen werden.

TABELLE 2

Probe	Volumen (ml)	Gesamtprotein (µg/ml)	rvWF (µg/ml)	rvWF/ Gesamtprotein
rvWF-Konzentrat	225	50	13,9	0,27
Elution mit 270 mM NaCl	43	70	60	0,86
Elution mit 1 M NaCl	32	25	2	0,08

Der gereinigte rvWF besitzt eine Aktivität von 4,32 U/mg rvWF:Ag in bezug auf die Plättchenaggregation.

BEISPIEL 3

Mittels Heparin Affinitätschromatographie wurden sowohl plasmatischer vWF (p-vWF), vWF aus Kryopräzipitat (k-vWF) als auch rekombinanter vWF (r-VWF) gereinigt. Die unterschiedlichen vWF-Präparate wurden auf ihre Bindung zu Faktor VIII untersucht.

Tabelle 3

Probe	Stöchiometrie vWF : Faktor VIII
r-vWF	2,0 : 1
k-vWF	2,6 : 1
p-vWF	3,0 : 1

Tabelle 3 zeigt die Daten der Stöchiometrie von vWF : Faktor VIII. Die Daten zeigen, das r-vWF eine wesentlich höhere Bindungskapazität für Faktor VIII besitzt als p-vWF.

BEISPIEL 4

Stabilität von rekombinantem von Willebrand Faktor in Lösung

Eine von Willebrand Faktor-Präparation wurde, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt und in einem Puffer, enthaltend 5 g/l $\text{Na}_3\text{Citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l NaCl, 5 g/l Glycin, 5 g/l L-Lysin.HCl und 0,62 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0, so formuliert, daß die von Willebrand Faktor-Konzentration gemessen mittels Ristocetin-mediierter Plättchenaggregation 10 E/ml war. Eine derartige Lösung wurde bei 4 °C, 25 °C, 37 °C und 50 °C bis zu 70 Std gehalten. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und mittels der Ristocetin-medierten Plättchenaggregation auf ihre von Willebrand Faktor-Aktivität bestimmt.

Bei 4 °C und 25 °C kam es im Beobachtungszeitraum zu keiner Veränderung der Aktivität, bei 37 °C blieb die Aktivität über 24 Std über 80 % und selbst bei 50 °C war über 8 Std keine Veränderung der biologischen Aktivität festzustellen. Gleichzeitig wurde der Antigengehalt mittels ELISA ermittelt. Der Antigengehalt blieb bei allen Lagerungstemperaturen über die gesamte Meßdauer gleich dem Ausgangswert. Die Stabilitätsuntersuchung wurde ohne die üblichen Proteinstabilisatoren, wie Trägerproteine oder Zucker, durchgeführt.

BEISPIEL 5

Lyophilisationsverhalten von rekombinantem von Willebrand Faktor

Ein rekombinanter von Willebrand Faktor wurde, wie in Beispiel 4 beschrieben, formuliert und auf eine Aktivität von 10 E/ml eingestellt. Ohne weiteren Zusatz üblicher stabilisierender Agentien wurde nun gefrieretrocknet und anschließend im Ausgangsvolumen mit Wasser rekonstituiert. Danach wurde neuerlich die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität bestimmt. rvWF konnte mit einer Ausbeute von 80 % rekonstituiert werden. Als Vergleichsversuch wurde in Anwesenheit von 0,1 %igem humanem Serumalbumin lyophilisiert, dabei konnten 98 % der Ausgangsaktivität nach Rekonstitution erhalten werden.

BEISPIEL 6

Pharmakokinetik der Multimere von rekombinantem von Willebrand Faktor im Schwein.

Für die Untersuchung können von Willebrand-defiziente Tiere, wie z.B. die von Roussi et al., *Brit.J.Haematol.* 90:661-668 1995, beschriebenen homozygoten von Willebrand-defizienten Schweine, verwendet werden. In diesem Versuch

wurde ein 4 Monate altes, 37 kg schweres, weibliches, homozygoten von Willebrand-defizientes Schwein eingesetzt. Dieses war charakterisiert durch eine Blutungszeit von über 30 Minuten, gemessen nach der Ohrblutungsmethode von Samama et al., *Thromb.Haemostas.* 71:663-669, 1994, und einen von Willebrand Faktor-Plasmaspiegel von unter der Nachweisgrenze, sowohl im Antigen-ELISA als auch in der Ristocetincofaktoraktivität bestimmt. Die Faktor VIII-Aktivität betrug ca. 1 E/ml, gemessen als humaner Faktor VIII im 1-Stufen-Gerinnungstest, 2-Stufen-Gerinnungstest oder chromogenem Faktor VIII-Test (Immunochrom FVIII:C, Immuno).

Unter Narkose wurde dem Schwein eine erfindungsgemäße Präparation, die, wie in Beispiel 2 beschrieben, gewonnen wurde, in einer Dosis von 34 RCoF E/kg Körpergewicht injiziert. Unmittelbar vor der Infusion sowie 30 min, 1 Std, 2 Std, 3 Std, 6 Std, 9 Std, 12 Std, 24 Std, 32 Std und 48 Std nach Infusion wurden Blutproben genommen und daraus Citratplasma hergestellt.

Aus den Plasmaproben wurde die Struktur der von Willebrand Faktor-Multimere durch SDS-Agarosegelelektrophorese im 2 %igen Agarosegel nach der Methode von Ruggeri et al., *Blood* 57:1140-1143, bestimmt. Dabei wurden die von Willebrand Faktor-Multimere durch eine immunenzymatische Färbung nach Aihara et al., *Thromb.Haemostas.* 55:263-267, 1986, sichtbar gemacht. Als primärer Antikörper wurde ein Kaninchen-anti-von Willebrand Faktor-Antiserum (Dakopatts, Glostrup, Denmark) in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein alkalische Phosphatase-konjugierter, affinitätsgereinigter Ziegen-anti-Kaninchen-

IgG H + L Antikörper (Axell, Accurate Chemical and Scientific Corp., NY) in einer Verdünnung von 1:1000. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels des Nitroblau-tetrazolium-chloridbrom-indolyl-phosphatsubstratsystems.

Vor Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Präparat konnte kein von Willebrand Faktor im Schwein nachgewiesen werden. Nach Gabe des Präparates zeigte sich eine für den nativen Zustand atypische Struktur eines aus Singulett bestehenden Multimerenmusters, welches auf einen nicht proteolytisch verdauten von Willebrand Faktor zurückzuführen ist. Diese Struktureigenschaft blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum unverändert, d.h. keine proteolytische Degradation des Präparates fand statt. Das Präparat wurde allerdings entsprechend der Pharmakokinetik aus der Zirkulation sukzessive eliminiert. Multimere des niedrigsten Molekulargewichtes blieben bis zu 48 Stunden nach Infusion des Präparates nachweisbar.

Aus den Infusionsexperimenten konnte eine Halbwertszeit des erfindungsgemäßen von Willebrand Faktor von etwa 30 Stunden kalkuliert werden. Als makroskopischen Parameter für die Normalisierung des im defizienten Tier gestörten Gerinnungssystems wurde die Blutungszeit bestimmt, die von über 30 Minuten vor Infusion des von Willebrand Faktors auf ca. 13 Minuten nach Infusion korrigiert werden konnte, wobei dieser Effekt auch noch 32 Stunden nach der Infusion nachweisbar war.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur Gewinnung von hochreinem von Willebrand-Faktor, bei dem rekombinanter von Willebrand-Faktor (rvWF) durch eine Anionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp in einer Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen und gegebenenfalls Salz chromatographisch gereinigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der durch die Anionenaustauschchromatographie gereinigte rvWF weiterhin durch eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Heparin in einer Pufferlösung, bestehend aus Puffersubstanzen und gegebenenfalls Salz, chromatographisch gereinigt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man ein rvWF-Konzentrat aus zellfreien Kulturüberständen transformierter Zellen reinigt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pufferlösung ein von Stabilisatoren, Aminosäuren und anderen Zusätzen freies Puffersystem verwendet.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Anionenaustauschchromatographie und/oder die Affinitätschromatographie in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, und vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7,4, durchgeführt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der bei der Anionenaustauschchromatographie an den Anionenaustauscher und bei der Affinitätschromatographie an immobilisiertes Heparin gebundene rvWF durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der quaternäre Anionenaustauscher ein Fraktogel mit Tentakelstruktur ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anionenaustauscher ein EMD-TMAE-Fraktogel ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der rvWF an den Anionenaustauscher bei einer Salzkonzentration von < 270 mM bindet, und bei einer Salzkonzentration > 270 mM, und vorzugsweise bei > 280 mM, eluiert wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätschromatographie an einem Träger mit daran gebundenem Heparin durchgeführt wird, wobei sich bevorzugt AF-Heparin-Toyopearl[®] (Tosohaas), Heparin EMD-Fraktogel[®] (Merck) oder Heparin Sepharose Fast Flow[®] (Pharmacia) gleichermassen eignen.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der in der Anionenaustauschchromatographie vorgereinigte rvWF an das immobilisierte Heparin bei einer Salzkonzentration < 150 mM bindet und bei einer Salzkonzentration > 150 mM, vorzugsweise bei 200 bis 300 mM, bevorzugter 160 bis 270 mM eluiert wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11; dadurch gekennzeichnet, dass als Salze lösliche ein- und zweiwertige Salze verwendet werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Salz NaCl verwendet wird.
14. rvWF, der frei von Blutplasma proteinen, insbesondere frei von Faktor VIII, frei von pathogenen Viren ist und eine hohe Bindungskapazität für Faktor VIII aufweist, erhältlich nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. rvWF nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass er physiologisch aktiv ist.
16. Verwendung eines rvWF nach Anspruch 14 und/oder 15 zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand-Disease.
17. Verwendung eines rvWF nach Anspruch 14 und/oder 15 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand-Disease.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen oder mehrere rvWF nach Anspruch 14 und/oder 15 in einem physiologisch annehmbaren Träger enthält.
19. Stabile pharmazeutische Präparation enthaltend virus-sicheren rekombinanten von Willebrand Faktor (rvWF), der aus Multimeren mit einer hohen strukturellen Integrität besteht erhältlich aus einer rvWF-haltigen Fraktion durch ein chromatographisches Reinigungsverfahren wobei die Multimeren proteolytisch nicht abgebaut werden.
20. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 19, welche in Lösung bei Raumtemperatur mindestens 50 Stunden stabil bleibt.
21. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Lösung lagerstabil ist.
22. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Infusionspräparat vorliegt.
23. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der rvWF als nicht-fragmentiertes Protein enthalten ist.
24. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der rvWF nach elektrophoretischer Analyse Multimerenbanden zeigt in Abwesenheit von Satellitenbanden.

25. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie formuliert ist zur Verabreichung an einen Patienten ohne Nebenwirkungen wie Thrombosebildung, Thrombozytenaktivierung oder Thrombozytopenie hervorzurufen.

26. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie Salze, wie Natriumchlorid und Kalziumchlorid, und Aminosäuren, wie Glycin und Lysin, enthält, bei einem pH im Bereich von 6-8.

27. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die rvWF-haltige Fraktion erhalten wird aus einer Zellkultur.

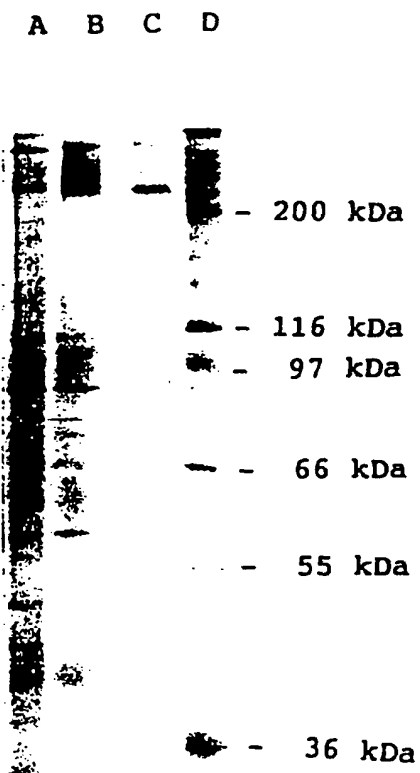
28. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die rvWF-haltige Fraktion zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt ist.

29. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der rvWF nach Verabreichung an ein Säugetier das Multimerenmuster mit einer Singulettstruktur beibehält.

30. Verwendung eines rvWF nach Anspruch 14 oder 15 zur Stabilisierung von Vektor VIII, rekombinantem Faktor VIII oder funktionellen Deletionsmutanten von Faktor VIII.

1/1

FIG. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/755 A61K38/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,89 12065 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION) 14 December 1989 cited in the application see claims; examples ---	1,2, 14-17
A	EP,A,0 469 985 (ASS D AQUITAINE POUR LE DEV DE) 5 February 1992 cited in the application see claims; examples ---	1,2, 14-17
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 1996

Date of mailing of the international search report

05.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 95/03892

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VOX SANGUINIS, vol. 62, no. 1, February 1992 BASEL, CH, pages 1-11, M. BURDOUF-RADOSEVICH UND T. BURNOUF 'Chromatographic Preparation of a Therapeutic Highly Purified von Willebrand Factor Concentrate from Human Cryoprecipitate' cited in the application see page 2, right column, paragraph 3 - page 5, left column, paragraph 2; figures 2,3</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 14-17</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP/03892

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claim 16 relates to a method for treatment of (a diagnostic procedure carried out on) the human or animal body, the search has nevertheless been carried out, based on the indicated effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/03892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8912065	14-12-89	FR-A- 2632309	08-12-89
		AT-T- 121750	15-05-95
		AU-B- 1138392	14-05-92
		AU-B- 622436	09-04-92
		AU-B- 3068289	05-01-90
		DE-D- 68922358	01-06-95
		DE-T- 68922358	12-10-95
		EP-A- 0359593	21-03-90
		ES-T- 2070919	16-06-95
		JP-T- 3501974	09-05-91
		LT-A, B 262	25-10-94
		NO-B- 177188	24-04-95
		SU-A- 1837880	30-08-93
		US-A- 5252709	12-10-93
EP-A-0469985	05-02-92	FR-A- 2665449	07-02-92
		JP-A- 4234400	24-08-92
		US-A- 5252710	12-10-93

Internat. Aktenzeichen
PCT/EP 95/03892

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/755 A61K38/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,89 12065 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION) 14.Dezember 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,2, 14-17
A	EP,A,0 469 985 (ASS D AQUITAINE POUR LE DEV DE) 5.Februar 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,2, 14-17
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Januar 1996

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

05.03.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>VOX SANGUINIS, Bd. 62, Nr. 1, Februar 1992 BASEL, CH, Seiten 1-11, M. BURDOUF-RADOSEVICH UND T. BURNOUF 'Chromatographic Preparation of a Therapeutic Highly Purified von Willebrand Factor Concentrate from Human Cryoprecipitate' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 5, linke Spalte, Absatz 2; Abbildungen 2,3</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 14-17</p>

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 16
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des (ein Diagnoseverfahren durchgeführt am) menschlichen bzw. tierischen Körpers bezieht, wurde trotzdem eine Suche durchgeführt, die auf den angegebenen Effekten der Verbindung bzw. Zusammensetzung basiert.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. des Aktenzeichen

PCT/EP 95/03892

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-8912065	14-12-89	FR-A- 2632309	08-12-89
		AT-T- 121750	15-05-95
		AU-B- 1138392	14-05-92
		AU-B- 622436	09-04-92
		AU-B- 3068289	05-01-90
		DE-D- 68922358	01-06-95
		DE-T- 68922358	12-10-95
		EP-A- 0359593	21-03-90
		ES-T- 2070919	16-06-95
		JP-T- 3501974	09-05-91
		LT-A,B 262	25-10-94
		NO-B- 177188	24-04-95
		SU-A- 1837880	30-08-93
		US-A- 5252709	12-10-93
EP-A-0469985	05-02-92	FR-A- 2665449	07-02-92
		JP-A- 4234400	24-08-92
		US-A- 5252710	12-10-93